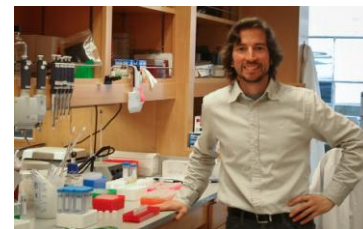


SEBBM DIVULGACIÓN

LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO



Citometría multiparamétrica y de masas: tecnología láser en busca de células madre leucémicas

Ernesto Díaz-Flores
Universidad de California, San Francisco

Biografía

Ernesto Díaz-Flores se licenció en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid en el año 1998. Realizó sus estudios de doctorado bajo la dirección de la Dra. Isabel Mérida en el Centro Nacional de Biotecnología estudiando el papel de las lípido-kinasas en la activación de linfocitos. Se doctoró en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid en el año 2003. Tras recibir su doctorado se trasladó a Estados Unidos para incorporarse al grupo del Dr. Kevin Shannon de la Universidad de California San Francisco para estudiar el papel del oncogen K-Ras en las leucemias mieloides agudas. En el año 2006 recibió el premio al Joven Investigador (Young Investigator Award) por parte de la Children's Tumor Foundation. Actualmente trabaja en el grupo de la Dra. Mignon Loh como científico especialista buscando nuevas terapias para las leucemias linfoides B hipodiploides agudas, las cuales no responden a ningún tratamiento de quimioterapia.

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA:
http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/la-ciencia-al-alcance-de-la-mano-articulos-de-divulgacion_29

SEBBM
SEBBM

Sociedad Española
de Bioquímica y
Biología Molecular

Resumen

El sistema hematopoiético contiene un grupo heterogéneo de subpoblaciones celulares. La alteración de una o varias proteínas es suficiente para que una sola célula proliferé descontroladamente transformándose en leucemia. El advenimiento en los últimos años de la citometría de flujo multiparamétrica y de masas ha sido clave para identificar alteraciones en las proteínas a nivel de célula única.

Summary

The hematopoietic system contains a heterogeneous Group of cellular subpopulations. Alterations in one or several proteins is enough for a single cell to trigger uncontrolled proliferation resulting in leukemia. The advent in recent years of multiparametric flow cytometry and mass cytometry has been key to identify protein alterations at a single cell level.

En la década de los 80 Kary Mullis revolucionó el mundo de la secuenciación genética con su desarrollo de la actual PCR permitiendo incluso amplificar picogramos de ADN (1). Los 90 vieron nacer el "Human Genome Project" que culminó en el 2004 con la secuenciación completa del primer genoma humano (2). Era el primer paso para entender las claves de la biología y el desarrollo humanos. Cuatro años más tarde, el Dr. Tim Ley publicó la secuencia génica de

una paciente con leucemia mieloide aguda. Un trabajo pionero y fascinante de un año entero que costó un millón de dólares y con el que se esperaba identificar todas las mutaciones que hasta entonces habían conseguido burlar las mejores técnicas de secuenciación (3). Sin embargo no se encontraron muchas más mutaciones de las ya conocidas y eso rebajó las ilusiones puestas en la secuenciación. Se había encontrado el arca perdida pero ahí no estaba el santo grial. Seguíamos sin saber las claves de la vida y también de la muerte, en este caso por leucemia.

Recordemos, sin embargo, que los genes sólo encierran la información para producir proteínas que son las que en realidad controlan las funciones celulares y por tanto de los seres vivos. Es imprescindible, por tanto, conocer cómo las mutaciones afectan las funciones proteicas en pequeñas poblaciones celulares generando una leucemia, algo que requiere del campo de la bioquímica. Hasta el segundo milenio las técnicas bioquímicas requerían cantidades elevadas de células para analizar el contenido proteico en las células y su activación. En el año 2004, un trabajo del laboratorio del Dr. Garry Nolan publicado en Cell mostraba la capacidad de analizar proteínas a nivel de célula única usando citometría de flujo (4). Se abría así una nueva era en el campo de la bioquímica.

El concepto es sencillo: obtener muestras de un paciente con células sanas y leucémicas, bien de sangre o de médula ósea e identificar las células con una función alterada.

Estimulación: las células son estimuladas (normalmente entre 1-30 minutos) con citoquinas o factores de crecimiento presentes en la sangre y frente a los cuales se sospecha que las células leucémicas tienen una respuesta alterada. Se compara la activación de las proteínas entre células sanas y cancerígenas para identificar qué proteínas están alteradas.

Inhibición: las células son incubadas con fármacos o inhibidores a dosis óptimas (o bien a dosis crecientes para determinar la concentración óptima) durante 30-60 minutos o incluso 24, 48 ó 72 horas para determinar el efecto de los inhibidores para bloquear la activación de las proteínas que se sospechan responsables de convertir la célula en célula leucémica. Esto permite estudiar el efecto de fármacos y agentes quimioterapéuticos *in vitro* antes de usarlos en pacientes.

Identificación de las células de interés mediante citometría de flujo: las células poseen distintos receptores (marcadores de superficie) según sean células madres, progenitoras, linfoides, mieloides... algunos específicos de células cancerígenas. Para identificar las células de interés, las muestras celulares se incuban con anticuerpos unidos a fluoróforos (que emiten luz al ser estimulados con láser) que reconocen dichos marcadores y se analizan por citometría de flujo. Las células en suspensión en tubos son introducidas en el citómetro a flujos de hasta 10.000 células/segundo. Ahí son excitadas una a una por hasta cuatro láseres de distinta λ (azul, rojo, violeta, ultravioleta) y unos sensores cuantifican la luz emitida por cada fluoróforo así como el tamaño y complejidad de cada célula.

Análisis de proteínas intracelulares a nivel de célula única mediante citometría multiparamétrica: hasta aquí llegaba la citometría convencional, pero la citometría multiparamétrica implementada por el grupo del Dr. Nolan, permite no sólo analizar la composición celular de una muestra

sino también fijar y permeabilizar las células para introducir anticuerpos que reconozcan las proteínas, incluso en su estado fosforilado (es decir, activado). Cada anticuerpo anti-proteína o anti-fosfoproteína está también unido a un fluoróforo distinto. Así, en total se pueden analizar entre 8 y 18 proteínas (superficiales e intracelulares) por célula en muestras heterogéneas, limitado sólo por la solapación de los espectros de emisión de los fluoróforos (5-6).

Un avance revolucionario ha sido el publicado en el 2011 por el grupo del Dr. Tanner en colaboración con el Dr. Nolan implementando la Citometría de masas (CyTOF) que sustituye a los fluoróforos por tierras raras (lantánidos) que solucionan este problema y que permiten combinar hasta 35 colores simultáneamente (7-8).

En conclusión, ahora cada vez que se descubre una nueva mutación génica, se puede investigar el efecto de dicha mutación en una o varias proteínas, y en una o varias poblaciones celulares de muestras de pacientes y estudiar su respuesta de inhibición selectiva por fármacos a nivel de célula única. Parece que se tienen ahora los medios para comprender la biología del cáncer. ¿Queda por ver si ésta es la década en la que por fin comprendamos el efecto de las distintas mutaciones en las funciones que gobiernan una célula para permitirle crecer, multiplicarse, dividirse, diferenciarse o morir!

Referencias

- 1) Saiki, Gelfand, Stoffel, Scharf, Higuchi, Horn, Mullis and Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 29: 1988, Vol. 239 no. 4839 pp. 487-491.
- 2) http://en.wikipedia.org/wiki/Human_Genome_Project
- 3) Mardis, Ding, Dooling and Ley. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome *Nat. Eng J Med.*, Sep 10; 2009, 361(11):1058-66.
- 4) Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruserud Ø, Gjertsen BT, Nolan GP. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell*. Jul 23; 2004, 118(2): 217-28.
- 5) Sachs, Perez, Pe'er, Lauffenburger and Nolan, Causal Protein-Signaling Networks Derived from Multiparameter Single-Cell Data. *Science* 22 April 2005.
- 6) Kotecha N, Flores NJ, Irish JM, Simonds EF, Sakai DS, Archambeault S, Diaz-Flores E, Coram M, Shannon KM, Nolan GP, Loh ML. Single-cell profiling identifies aberrant STAT5 activation in myeloid malignancies with specific clinical and biologic correlates. *Cancer Cell*. 2008 Oct 7;14(4):335-43.
- 7) Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Krutzik PO, Sachs K, Pe'er D, Tanner SD, Nolan GP. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science*. 2011 May 6;332 (6030):687-96.
- 8) Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD Jr, Bruggner RV, Linderman MD, Sachs K, Nolan GP, Plevritis SK. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat Biotechnol*. 2011 Oct 2;29(10):886-91.

Figura. Muestras de sangre o de médula ósea obtenidas de pacientes son incubadas con anticuerpos marcados con fluoróforos o con lantánidos. Las muestras son entonces analizadas mediante A) citometría de flujo multiparamétrica representando los datos mediante histogramas o bien mapas de calor (heatmaps) o bien mediante B)

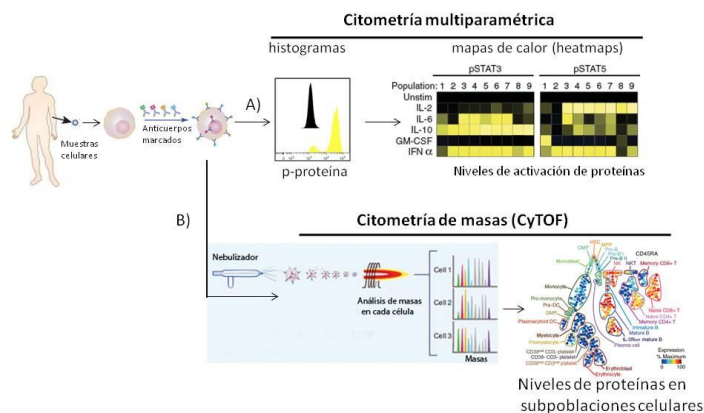


Figura: Niveles de proteínas a nivel de célula única.

Adaptada de Bendall and Nolan.

citometría de masas (CyTOF). Los niveles de proteínas son en ambos casos medidos a nivel de célula única en subpoblaciones celulares.